

0568038  
APPROVED 20 FEB 2005

Anmelder: Max-Planck-Gesellschaft; Jovin; Jares-Erijman  
Anwaltsakte: P-MPG 12 PCT

## 5 Photochromes relaxationskinetisches Verfahren

### Beschreibung

- 10 Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Bestimmung einer charakteristischen, kinetischen Größe einer chemischen Reaktion zwischen einer Mehrzahl chemischer Spezies in einer Probe, wobei wenigstens eine Spezies wenigstens einen Fluorophor enthält, umfassend die folgenden Schritte: Erzeugen eines Ungleichgewichtszustandes der chemischen Reaktion durch Beaufschlagung der Probe mit Licht und zeitaufgelöste  
15 Beobachtung wenigstens eines Abschnitts der Relaxation der Konzentrationen der beteiligten Spezies anhand eines Fluoreszenzsignals wenigstens eines Fluorophors.

- Derartige Verfahren, z.B. sogenannte Blitzlicht- (Flash-Photolysis) Verfahren, stellen spezielle Formen der allgemein als relaxationsspektroskopische Verfahren mit  
20 Fluoreszenzdetektion bekannten Verfahren dar. Den klassischen relaxationskinetischen Verfahren, wie sie beispielsweise beschrieben sind in Eigen, M.; DeMaeyer, L.: „Theoretical basis of relaxation kinetics“ in „Investigations of rates and mechanisms of reactions“, Teil III, 3, 3. Aufl. (G. Hammes, Hsg), *Techniques of Chem.*, Bd. 6, S. 63-148b (1974), liegt die Erkenntnis zugrunde, dass die Geschwindigkeitskonstanten  $k_f$  und  $k_r$  für  
25 die Hin- bzw. Rückreaktion und damit die Gleichgewichtslage einer chemischen (Teil-) Reaktion eine Funktion intensiver thermodynamischer Größen ist, insbesondere der Temperatur  $T$  und / oder des Drucks  $P$ . Eine entsprechende Offenbarung in der Patentliteratur findet sich in DE-OS 24 08 646. Durch plötzliche Veränderung einer intensiven thermodynamischen Größe wird daher die Gleichgewichtslage der chemischen  
30 Reaktion schnell verschoben, ohne dass die Konzentrationen der beteiligten Spezies instantan folgen könnten. Vielmehr relaxieren die Konzentrationen der beteiligten Spezies zeitverzögert in den neuen Gleichgewichtszustand. Form und Geschwindigkeit der

Relaxationsprozesse sind abhängig von der Komplexität der Gesamtreaktion sowie von den konkreten Werten der Reaktionskonstanten  $k_f$  und  $k_r$  der Reaktion bzw. ihren einzelnen Teilreaktionen. Durch geeignete spektroskopische Beobachtung des Relaxationsprozesses lassen sich daher Rückschlüsse auf die Kinetik der untersuchten chemischen Reaktion  
5 ziehen. Je nach speziell verwendeter Technik spricht man von P-Sprung-Verfahren, T-Sprung-Verfahren, Blitzlichtverfahren, etc.

Als eine geeignete Beobachtungsmethode hat sich die zeitaufgelöste Fluoreszenzspektroskopie bewährt. Weist nämlich wenigstens eine an der zu  
10 untersuchenden Reaktion beteiligte Spezies einen Fluorophor auf (sei es, dass die Spezies selbst fluoreszent ist oder dass sie mit einem geeigneten Fluorophor markiert ist), dessen Fluoreszenz in Abhängigkeit von dem Bindungszustand der Spezies variiert, kann der Relaxationsvorgang bei geeigneter Anregung anhand der Fluoreszenz sehr genau beobachtet werden.

15 Nachteilig bei dem bekannten Verfahren ist, dass jeweils eine intensive thermodynamische Größe verändert werden muss, was einerseits mit vergleichsweise großem technischen Aufwand verbunden ist und andererseits eine mögliche Belastung der chemischen Spezies darstellt. Insbesondere empfindliches biologisches Material kann dabei leicht geschädigt  
20 werden. Es sind zwar repetitive Verfahren bekannt, bei denen kleine Änderungen der relevanten intensiven thermodynamischen Größe zum Aufbau eines rauscharmen Signals vielfach wiederholt werden. Die Belastung der beteiligten Spezies kann dadurch zwar gegenüber einer einmaligen starken Auslenkung reduziert werden, für besonders empfindliches Material, insbesondere bei Untersuchungen an lebenden Zellen etc., können  
25 jedoch auch diese reduzierten Belastungen bereits zu groß sein. Zudem erfordern es die repetitive Verfahren in der Regel, vor jeder Auslenkung das Gleichgewicht wieder herzustellen.

Aus einem völlig anderen Gebiet der Fluoreszenzspektroskopie ist das Phänomen des sog.  
30 Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfers, kurz FRET genannt, bekannt. Dabei handelt es sich um einen strahlungslosen Energieübergang durch langreichweitige Dipol-Dipol-

Wechselwirkung von einem Partner eines FRET-Paares, nämlich dem sog. FRET-Donor, auf den anderen Partner, nämlich den sog. FRET-Akzeptor. Zwei Fluorophore können ein FRET-Paar bilden, wenn das Emissionsspektrum des FRET-Donors einen Überlappungsbereich mit dem Anregungsspektrum des FRET-Akzeptors aufweist. FRET weist eine sehr starke Abhängigkeit von der Distanz zwischen FRET-Donor und FRET-Akzeptor auf, nämlich  $R^{-6}$ , wo R der Abstand zwischen den Partnern eines FRET-Paares ist. Zu den theoretischen Grundlagen von FRET siehe z.B. Förster, T.: „Naturwissenschaften“, Bd. 6, S. 166-175 (1946), Stryer, L.: „Fluorescence energy transfer as a spectroscopic ruler“ Ann. Rev. Biochem. 1978, 47. 819-846. FRET-Experimente finden aufgrund der starken Abstandsabhängigkeit zum Beispiel Anwendung bei der Untersuchung der Anlagerung bestimmter Stoffe an biologische Strukturen, wobei bestimmte Bereiche der zu untersuchenden Strukturen sowie der sich anlagernde Stoff jeweils eine Partnerspezies eines FRET-Paares umfassen. Wird dann der FRET-Donor mit einem Licht geeigneter Wellenlänge angeregt, kann seine Anregungsenergie wenigstens teilweise strahlungslos auf den FRET-Akzeptor übergehen. Die Wahrscheinlichkeit eines solchen Übergangs ist, wie oben erläutert, stark vom Abstand der wechselwirkenden Moleküle abhängig. Vergleich der Donorfluoreszenz vor und nach Anlagerung des den FRET-Akzeptor umfassenden Stoffs kann Rückschlüsse auf das Ausmaß der Anlagerung erlauben. Es sind bildgebende FRET-Verfahren im Mikroskop sowie nicht-bildgebende Verfahren bekannt. Etwa bei der Strukturanalyse biologischer Moleküle oder bei DNA-Hybridisierungsexperimenten finden FRET-Verfahren zum Beispiel zur Nachbarschafts- oder Abstandsbestimmung vielfach Anwendung. EP 0 668 498 A2 offenbart eine zur Messung von FRET geeignete Apparatur und ein entsprechendes Messverfahren. Eine Verwendung von FRET zur Detektion bestimmter Moleküle ist beispielsweise bekannt aus DE 39 38 598 A2, in der ein auf FRET basierender Biosensor offenbart wird, sowie aus EP 1 271 133 A1, in der ein auf FRET basierendes Nachweisverfahren offenbart wird.

Aus dem Gebiet der organisch- / synthetischen Chemie sind seit kurzem photochrome Moleküle bekannt, die als schaltbare FRET-Akzeptoren eingesetzt werden können. Siehe hierzu zum Beispiel: Giordano, Jovin, Irie und Jares-Erijman „Diheteroarylethenes as Thermally Stable Photoswitchable Acceptors in Photochromic Fluorescence Resonance

Energy Transfer (pcFRET)“, J.AM.CHEM.SOC. 2002, 124, 7481-7489. Darin werden verschiedene Moleküle aus der Familie der Diheteroarylethene offenbart, die bei geeigneter Lichteinwirkung eine reversible Konformationsänderung zwischen einer offenen und einer geschlossenen Ringkonfiguration zeigen. Mit der Strukturänderung geht eine erhebliche  
5 Änderung des Anregungsspektrums des Moleküls einher. Ein derartiges Chromophor kann Anwendung finden als schaltbarer FRET-Akzeptor. Ist nämlich ein geeigneter FRET-Donor vorhanden, dessen Emissionsspektrum in stark unterschiedlicher Weise mit den Anregungsspektren der unterschiedlichen Konformationen des Chromophors überlappt, kann die FRET-Effizienz durch Bestrahlung mit dem konformationsändernden Licht  
10 variiert werden. Bei den in der genannten Druckschrift offenbarten Molekülen lässt sich durch Bestrahlung der Probe mit Licht unterschiedlicher Wellenlängen, insbesondere UV-Licht und sichtbares Licht, beliebig zwischen zwei photochromen Zuständen hin- und herschalten. Man kann salopp von einem An- und Ausschalten von FRET sprechen, wobei der angeschaltete Zustand einem größeren Überlappungsbereich des Emissionsspektrums  
15 des FRET-Donors mit dem Anregungsspektrum des FRET-Akzeptors entspricht - somit einer größeren FRET-Effizienz - und der ausgeschaltete Zustand einem kleineren Überlappungsbereich - somit einer geringeren FRET-Effizienz. Obwohl photochrome Moleküle in der Regel nicht fluoreszent sind, sind auch einige photochrome Fluorophore bekannt.

20 Ausgehend von den bekannten relaxationskinetischen Verfahren ist es die Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein gattungsgemäßes Verfahren derart weiter zu bilden, dass relaxationskinetische Messungen bei verminderter Belastung der an der Reaktion beteiligten Spezies ermöglicht werden.

25 Diese Aufgabe wird in Verbindung mit den Merkmalen des Oberbegriffs von Anspruch 1 dadurch gelöst, dass wenigstens ein zu untersuchendes Produkt der chemischen Reaktion eine Verbindung zweier Spezies umfasst, die jeweils einen Partner eines aus FRET-Donor und FRET-Akzeptor bestehenden FRET-Paares enthalten, wobei der FRET-Akzeptor ein  
30 Photochrom ist, dessen Absorptionsspektrum durch Beaufschlagung mit Licht einer geeigneten Wellenlänge änderbar ist, der FRET-Donor ein Fluorophor ist, dessen

Emissionsspektrum mit dem Absorptionsspektrum des FRET-Akzeptors einen Überlappungsbereich aufweist, dessen Größe von dem photochromen Zustand des FRET-Akzeptors abhängt und das zur Erzeugung des Ungleichgewichtszustandes der chemischen Reaktion verwendete Licht eine den photochromen Zustand des FRET-Akzeptors schaltende Wellenlänge aufweist.

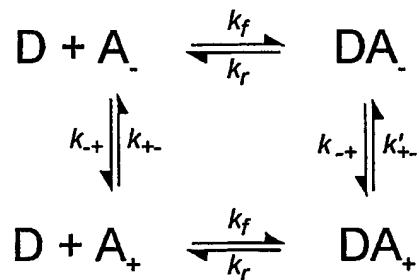
Dem liegt zunächst die Idee der Umkehrung des Anwendungsprinzips herkömmlicher relaxationskinetischer Messungen zugrunde. Wie erläutert, wird bei diesen durch Änderung einer intensiven thermodynamischen Größe die Gleichgewichtslage der Reaktion verändert und die Relaxation der Konzentrationen in den neuen Gleichgewichtszustand beobachtet. Bei der vorliegenden Erfindung werden dagegen die relativen Konzentrationen der beteiligten Spezies plötzlich verändert, und deren Rückkehr in den (thermodynamisch unveränderten) Gleichgewichtszustand beobachtet. Man beachte, dass zur Änderung der relativen Konzentrationen hier keine Stoffzugabe, wie etwa bei Titrationsexperimenten erforderlich ist. Die Konzentrationsänderung erfolgt durch Schalten des photochromen FRET-Akzeptors von seinem ersten in einen zweiten photochromen Zustand. Von diesem Schaltvorgang ist die den FRET-Akzeptor umfassende Spezies sowohl als freier Ligand wie auch in gebundenem Zustand betroffen. Ein Ungleichgewichtszustand entsteht, da, wie nachfolgend anhand eines Beispiels detaillierter erläutert werden soll, im gebundenen Zustand ein FRET-vermittelter Abregungskanal zur Verfügung steht, der für den freien Liganden nicht gegeben ist. Am Ende des Schaltvorgangs liegt daher im Vergleich zu dem freien Liganden ein zu geringer Anteil des gebundenen Zustandes mit dem FRET-Akzeptor in geändertem photochromen Zustand vor. Die Rückkehr des Systems in seinen Gleichgewichtszustand kann auf unterschiedliche Weise durch zeitaufgelöste Fluoreszenzmessung erfolgen, da die photochromen Zustände im gebundenen Zustand anhand der unterschiedlichen FRET-Effizienz von einander unterschieden werden können.

Obgleich in vielen Anwendungsfällen die Interaktion mehrerer an einer Reaktion beteiligter Spezies untersucht werden soll, sie jeweils mit einem als FRET-Donor oder FRET-Akzeptor wirkenden Fluorophors bzw. Photochroms markiert sind, umfasst die Erfindung auch Fälle, in denen das Fluorophor bzw. Photochrom selbst als Reaktand

beteiligt ist. Der Begriff „freier Ligand“ umfasst im Rahmen dieser Beschreibung alle Zustände, in denen der Abstand zwischen den FRET-Partnern zu groß ist, als dass ein nennenswerter FRET stattfinden könnte; mit „gebundener Zustand“ oder „Komplex“ ist im Gegensatz dazu jeder Zustand gemeint, in dem die FRET-Partner hinreichend nahe zueinander angeordnet sind. Insbesondere sollen diese Begriffe nicht als Einschränkung auf bestimmte chemische Bindungsformen verstanden werden.

Zum besseren Verständnis sei nachfolgend ein Beispiel einer besonders einfachen Reaktion erläutert, auf die die Erfindung jedoch keineswegs beschränkt ist und die allein der Illustration dienen soll.

Eine erste Spezies umfasst einen FRET-Donor und wird allgemein mit D bezeichnet. Eine zweite Spezies umfasst erfindungsgemäß einen photochromen FRET-Akzeptor und wird allgemein als A bezeichnet. Durch kurzfristige Bestrahlung mit einem intensiven UV-Lichtpuls wird eine Konformationsänderung des photochromen Akzeptors ausgelöst, der photochrome Akzeptor wird „eingeschaltet“. Die Spektren von D und A sind derart aufeinander abgestimmt, dass D mit A im „eingeschalteten“ Zustand ( $A_+$ ) ein effizientes FRET-Paar bildet, während im „ausgeschalteten“ Zustand ( $A_-$ ) nur ein minimaler FRET zwischen D und A möglich ist. Die interessierende chemische Reaktion umfasst die Komplexbildung der Spezies D und A zu dem Komplex DA, wobei  $DA_+$  und  $DA_-$  jeweils den ein- bzw. ausgeschalteten Zustand des FRET-Akzeptors in gebundenem Zustand bezeichnen. Nachfolgend ist ein Reaktionsschema dargestellt, welches das Gesamtsystem bei Beaufschlagung mit einer den photochromen Zustand von A schaltenden Wellenlänge (z.B. im UV-Bereich) illustriert.



(1)

- $k_f$  und  $k_r$  sind die Geschwindigkeitskonstanten der Hin- bzw. Rückreaktion der Komplexbildung. Sie seien der Einfachheit halber als für den ein- und den ausgeschalteten Zustand von A gleich angenommen, obwohl dies für den Grundgedanken der vorliegenden Erfindung nicht zwingend ist.  $k_+$  sei die Geschwindigkeitskonstante für den photochromen Übergang von dem ausgeschalteten Zustand des Akzeptors ( $A_-$ ) zum eingeschalteten Zustand des Akzeptors ( $A_+$ ), während  $k_-$  die Geschwindigkeitskonstante für den photochromen Übergang vom eingeschalteten zum ausgeschalteten Zustand des Akzeptors darstellt. Wie im Rahmen der speziellen Beschreibung anhand von Figur 1 und 2 näher erläutert werden soll, unterscheiden sich die Geschwindigkeitskonstante für den photochromen Ausschaltvorgang des freien Liganden A ( $k_{+-}$ ) und diejenige des Komplexes DA ( $k'_{+-}$ ). Grund hierfür ist ein FRET-vermittelter Anregungskanal, der den Ausschaltvorgang für den Komplex DA effizienter ausfallen lässt als für den freien Liganden A ( $k'_{+-} > k_{+-}$ ).
- Dadurch entsteht ein Konzentrationsverhältnis, das mit der thermodynamischen Gleichgewichtslage nicht in Einklang steht. Ausgehend von diesem erzeugten Ungleichgewicht kommt es zum Konzentrationsausgleich, d.h. zur Relaxation mit – im vorliegenden, einfachen Fall - einer Relaxationszeit  $\tau = 1/(k_f[D] + k_r)$ , die von den klassischen Relaxationsverfahren her wohlbekannt ist. Bei komplexerer Reaktion ist ein multiexponentiales Relaxationsverhalten zu erwarten, das ebenfalls über bekannte Gleichungen mit den beteiligten Geschwindigkeitskonstanten in Beziehung steht. Der Relaxationsvorgang kann anhand der Fluoreszenz wenigstens einer der beteiligten Fluorophore beobachtet werden.
- Neben dem bereits erwähnten Vorteil der sehr schonenden Auslenkung der Konzentrationen hat das erfindungsgemäße Verfahren gegenüber den herkömmlichen Relaxationsverfahren den Vorzug, technisch besonders einfach realisierbar zu sein, da zur Einstellung des Ungleichgewichtszustandes lediglich eine steuerbare Lichtquelle geeigneter Wellenlänge zur Verfügung stehen muss. Durch die Einfachheit seines Aufbaus eignet sich das Verfahren auch zur Verwendung in tragbaren Vorrichtungen zur schnellen Vor-Ort-

Messung, etwa beim Aufspüren spezieller, die Kinetik einer Reaktion beeinflussender chemischer Substanzen.

5 Zudem ermöglicht die schnellere Anwendbarkeit eines Strahlungsblitzes im Vergleich zu einer Temperatur- oder Druckänderung eine bessere zeitliche Auflösung der zu messenden Kinetiken.

Darüber hinaus ist das Verfahren zur Anwendung auf sehr geringe Volumina geeignet und kann daher auch z.B. zu bildgebenden Kinetik-Messungen im Mikroskop eingesetzt  
10 werden, wobei als Proben u.a. auch lebende Zellen in Frage kommen.

Selbstverständlich können jedoch auch Untersuchungen an Lösungen o.ä. vorgenommen werden, wobei sich durch vorgenannten Vorteile Anwendungsmöglichkeiten im Rahmen von miniaturisierten Screening-Verfahren mit hohem Probendurchsatz ergeben (Mikro-  
15 (Nano-) well-assays, Mikro- (Nano-) array-assays etc.).

Zur Beobachtung der Relaxation kann die Fluoreszenz des FRET-Donors gemessen werden. Alternativ ist es auch möglich, zur Beobachtung der Relaxation die Fluoreszenz des FRET-Akzeptors zu messen, sofern es sich hierbei um ein fluoreszentes Photochrom  
20 handelt. Selbstverständlich ist es ebenso möglich, über verschiedene Messkanäle beide Arten von Fluoreszenz zu erfassen.

Bei einer anderen Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens umfasst das zu untersuchende Produkt einen weiteren Fluorophor, der einen weiteren FRET-Akzeptor zu  
25 dem FRET-Donor darstellt. Dieser zusätzliche FRET-Akzeptor kann beispielsweise an demselben Molekül vorliegen, das auch den ersten, photochromen FRET-Akzeptor umfasst. Selbstverständlich ist es auch möglich, dass der weitere FRET-Akzeptor von einem Dritten an der Reaktion beteiligten Molekül umfasst wird. Der weitere FRET-Akzeptor muss nicht notwendig ein Chromophor sein. Ausgehend von dieser  
30 experimentellen Konstellation, kann zur Beobachtung der Relaxation der FRET-Donor isoliert angeregt und die Fluoreszenz des weiteren FRET-Akzeptors gemessen werden. Der



weitere FRET-Akzeptor steht in Bezug auf die Energieübertragung von dem FRET-Donor in Konkurrenz zu dem ersten, photochromen Akzeptor. Seine Fluoreszenz ist daher zum einen von der räumlichen Konstellation zu dem FRET-Donor und zum anderen von dem photochromen Zustand des ersten FRET-Akzeptors abhängig. Somit lassen sich die  
5 erforderlichen kinetischen Informationen auch aus der Fluoreszenz des weiteren FRET-Akzeptors gewinnen. Ist etwa der erste, photochrome FRET-Akzeptor selbst nicht fluoreszent und lagert er sich bei der zu untersuchenden Reaktion, z.B. einer DNA-Hybridisierung, wesentlich näher an den FRET-Donor an als der weitere, fluoreszente FRET-Akzeptor, wird mit dem Ein- und Ausschalten des photochromen FRET-Akzeptors  
10 der Energietransfer zu dem weiteren, fluoreszenten FRET-Akzeptor und damit dessen Fluoreszenz aus- bzw. eingeschaltet. Beobachtung nur der Fluoreszenz des weiteren, fluoreszenten FRET-Akzeptors stellt daher ein besonders sensitives Messverfahren dar, da hierbei nur Komplexe im ausgeschalteten Zustand detektiert werden, deren Relaxation also isoliert beobachtet werden kann.

15

Bei einer günstigen Wahl des photochromen FRET-Akzeptors ist die Änderung seines photochromen Zustandes in eine erste Richtung durch Bestrahlung der Probe mit Licht einer ersten Wellenlänge möglich, während die Änderung seines photochromen Zustandes in eine zweite Richtung durch Bestrahlung mit Licht einer zweiten Wellenlänge erfolgt.  
20 Dieses Verhalten ist besonders günstig, da damit durch spezielle Wahl der Bestrahlungswellenlänge die Schaltrichtung, d. h. von „Ein“ nach „Aus“ bzw. von „Aus“ nach „Ein“ bestimmen lässt. Selbstverständlich ist es grundsätzlich auch möglich, dass das photochrome Molekül mehr als zwei photochrome Zustände einnehmen kann, die mit unterschiedlichen Wellenlängen schaltbar sind..

25

Besonders günstig ist es, wie etwa bei der Familie der Diheteroarylethene, wenn die Änderung des photochromen Zustandes des FRET-Akzeptors in wenigstens eine Richtung durch Bestrahlung mit ultravioletem Licht erfolgt. Dieses Licht kann gleichzeitig zur Anregung des FRET-Donors verwendet werden, da die meisten Fluorophore im  
30 ultravioletten Spektralbereich anregbar sind. Die entgegengesetzte Schaltung kann, wie

ebenfalls bei den Diheteroarylethenen der Fall, z.B. durch Anregung mit sichtbarem Licht erfolgen.

Günstigerweise ist der FRET-Donor zusätzlich im sichtbaren Spektralbereich anregbar.  
5 Dies ermöglicht etwa die gleichzeitige Anregung des Donors zusammen mit der photochromen Schaltung des FRET-Akzeptors unabhängig von der Schaltrichtung. Außerdem wird dadurch eine gezielte Anregung des FRET-Donors ermöglicht, ohne gleichzeitig die UV-vermittelte Schaltung des photochromen Akzeptors anzustoßen. Letzteres ist insbesondere möglich, wenn, wie bei einer bevorzugten Ausführungsform  
10 vorgesehen, die Bestrahlungsintensität zur Änderung des photochromen Zustandes des FRET-Akzeptors wesentlich stärker ist als die Bestrahlungsintensität zur Erzeugung der zu beobachtenden Fluoreszenz. Eine derartige experimentelle Konstellation ist in der Regel möglich, da bei gängigen Fluorophoren zur Anregung von Fluoreszenzen wesentlich geringere Bestrahlungsintensitäten erforderlich sind als für die Schaltung gängiger  
15 Photochrome.

Bei einer besonders günstigen Weiterbildung des erfindungsgemäßen Verfahrens ist vorgesehen, dass zur Änderung des photochromen Zustandes des FRET-Akzeptors die Probe zeitlich moduliert bestrahlt wird. Darunter sind sich zeitlich ändernde  
20 Bestrahlungsintensitäten zu verstehen. Die Schaltung erfolgt dann vorzugsweise gem. einer repetitiven „forcing function“. Das detektierte Signal wird dann einer Faltung der forcing function mit dem eigentlichen Relaxationssignal sein.

Ein Sonderfall der modulierten Bestrahlung ist einsetzbar, wenn das Ein- und Ausschalten  
25 des photochromen FRET-Akzeptors mittels Licht zweier unterschiedlicher Wellenlängen erfolgt, dann nämlich kann vorgesehen sein, dass zur Änderung des photochromen Zustandes des FRET-Akzeptors die Probe alternierend mit Licht der ersten und der zweiten Wellenlänge bestrahlt wird. Je nach speziellem Anwendungsbereich können so beliebige Schaltmuster realisiert werden. Die jeweils günstigste Wahl eines Schaltmusters hat in  
30 Abstimmung auf die sonstigen experimentellen Gegebenheiten sowie das experimentelle Ziel zu erfolgen. Die spezielle Wahl des Bestrahlungsmusters ist auch abhängig von den

Eigenschaften des verwendeten Photochroms, welches z.B. eine unterschiedliche Stabilität seiner photochromen Zustände zeigen kann, sodass auch ohne aktives Zurückschalten eine auf thermischer Abregung basierende Rückkehr in einen der photochromen Zustände erfolgen kann.

5

Zum Aufbau einer Vorrichtung zur Durchführung des oben erläuterten Verfahrens ist es grundsätzlich nur erforderlich, eine Probenaufnahme, wenigstens eine steuerbare Lichtquelle zur zeitlich und spektral gesteuerten Bestrahlung der in der Probenaufnahme befindlichen Probe, wenigstens einen zur zeitaufgelösten Messung geeigneten  
10 Lichtdetektor zur Erfassung von Fluoreszenzlicht, welches von der Probe infolge der Bestrahlung emittiert wird, und eine Steuereinheit, welche – in der Regel programmtechnisch – zur Ansteuerung der wenigstens einen Lichtquelle und des wenigstens einen Lichtdetektors gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren eingerichtet ist, vorzusehen. Zur automatisierten Auswertung kann vorzugsweise weiter eine entsprechend  
15 programmierte Auswerteeinheit vorgesehen sein. Durch die Vereinfachungen, die sich aus dem erfindungsgemäßen Verfahren ggü. herkömmlichen Relaxationsverfahren ergeben, können bei einer besonders bevorzugten Ausführungsform z.B. zum mobilen Einsatz alle Vorrichtungskomponenten in einem tragbare Gehäuse integriert sein.

20 Weitere Einzelheiten der Erfindung ergeben sich aus der nachstehenden, ausführlichen Beschreibung und den beigefügten Zeichnungen, in denen das erfindungsgemäße Prinzip beispielhaft veranschaulicht ist.

In den Zeichnungen zeigen:

25

Figur 1: ein Schaltschema eines photochromen FRET-Akzeptors als freier Ligand.

Figur 2: ein Schaltschema eines photochromen FRET-Akzeptors im gebundenen Zustand mit einem FRET-Donor.

30

Figur 3: drei simulierte Konzentrationskurven als Ergebnis des erfindungsgemäßen Verfahrens.

Figur 4: eine schematische Darstellung einer Komplexbildungsreaktion mit zwei FRET-Akzeptoren.

Figur 1 zeigt das Schaltschema eines photochromen FRET-Akzeptors A als freier Ligand im weiter oben erläuterten, weit gefassten Sinn. So sind beispielsweise auch große biologische Moleküle umfasst, die mit dem photochromen Akzeptor A markiert sind und die sich im Rahmen der zu untersuchenden Reaktion zum Beispiel an andere biologische Strukturen anlagern. A bezeichnet den FRET-Akzeptor im ausgeschalteten Grundzustand.  $A^*$  repräsentiert den photochromen FRET-Akzeptor im ausgeschalteten, energetisch angeregten Zustand.  $A_+$  bezeichnet den FRET-Akzeptor im eingeschalteten Grundzustand.  $A_+^*$  bezeichnet den FRET-Akzeptor im eingeschalteten, photonisch angeregten Zustand.

Bei Bestrahlung der Probe mit Licht, welches in der Lage ist, einen Übergang des FRET-Akzeptors vom ausgeschalteten zum eingeschalteten Zustand auszulösen, z. B. Licht im ultravioletten Spektralbereich, gehen Anteile der Spezies A vom Zustand A in den Zustand  $A^*$  über. Dies erfolgt mit der Geschwindigkeitskonstante  $k_{ex}^{A^*}$ . Von dem angeregten Zustand  $A^*$  erfolgt eine teilweise Rückkehr in den Grundzustand mit der Geschwindigkeitskonstante  $k_d^{A^*}$ . Ein anderer Teil geht mit der Geschwindigkeitskonstante  $k_+$  über in den eingeschalteten Zustand  $A_+$ .

Auch im Zustand  $A_+$  befindliche Moleküle sind durch das eingestrahlte Licht energetisch anregbar. Es erfolgt daher parallel eine Anregung in den Zustand  $A_+^*$ , und zwar mit der Geschwindigkeitskonstante  $k_{ex}^{A_+^*}$ . Ähnlich wie im zuvor geschilderten Fall kehrt ein Teil der Moleküle im Zustand  $A_+^*$  mit der Geschwindigkeitskonstante  $k_d^{A_+^*}$  zurück zum Grundzustand  $A_+$ , während andere Teile die absorbierte Anregungsenergie zum Übergang in den ausgeschalteten Zustand A nutzen. Insgesamt lässt sich das Schaltschema als einfache Reaktion mit monoexponentieller Kinetik und den Geschwindigkeitskonstanten  $k_+^2$  und  $k_+^{-2}$  für den Einschalt- und den Ausschaltvorgang darstellen.

Figur 2 zeigt das gleiche Schaltschema wie Figur 1, jedoch für den Fall, dass der photochrome FRET-Akzeptor in mit dem FRET-Donor gebundener Form vorliegt. Der Begriff „gebunden“ im oben erläuterten Sinn ist hier weit zu verstehen. Beispielsweise können Reaktionspartner einer DNA-Hypretisierung mit den entsprechenden Fluorophoren markiert sein. Der „gebundene“ Zustand wird allgemein als Komplex DA bezeichnet. Der innere Kreis des Schaltschemas entspricht dem in Figur 1. Allerdings ergeben sich hier zusätzlich Kanäle. Zum einen erfolgt durch die Bestrahlung eine Anregung des FRET-Donors, so dass sich ein Zustand  $D^*A$  ergibt. Dieser entsteht mit der Geschwindigkeitskonstante  $k_{ex}^D$ . Ein großer Teil der so angeregten Moleküle kehrt zurück in den Grundzustand DA und zwar mit der Geschwindigkeitskonstante  $k_d^D$ . Diese umfasst u.a. die Fluoreszenzemission. Bei einem anderen Teil der Moleküle im Zustand  $D^*A$  kommt es durch FRET zu einem Übergang in den Zustand  $DA^*$ . Da sich der FRET-Akzeptor jedoch im ausgeschalteten Zustand befindet ( $A$ ) ist die Effizienz dieses Übergangs sehr gering.

Ähnlich dem zuvor geschilderten Anregungsweg werden auch Moleküle im Zustand  $DA_+$  durch die Bestrahlung mit der Geschwindigkeitskonstante  $k_{ex}^D$  in den energetisch angeregten Zustand  $D^*A_+$  versetzt. Auch hier ergibt sich eine teilweise Rückkehr in den Grundzustand  $DA_+$  mit der Geschwindigkeitskonstante  $k_d^D$ . Ein anderer Teil der Moleküle im Zustand  $D^*A_+$  erfährt einen Energieübergang über FRET in den Zustand  $DA_+^*$ . Da sich hier aufgrund des eingeschalteten Zustands des FRET-Akzeptors ( $A_+$ ) eine hohe FRET-Effizienz ergibt, kommt es zu einer Asymmetrie des gesamten Systems, die zu einer Unterbesetzung des Zustandes  $DA_+$  des gebundenen FRET-Paares im Vergleich zu der Besetzung des Zustandes  $A_+$  des freien FRET-Akzeptors führt.

Diese Asymmetrie führt zu der oben in Verbindung mit Reaktionsgleichung (1) erwähnten Ungleichheit der Geschwindigkeitskonstanten  $k_{+}$  und  $k'_{+}$ , d.h. zu den unterschiedlichen Auswirkungen der Bestrahlung auf der linken und der rechten Seite der Gleichung der Beispielreaktion. Es ist offensichtlich, dass hierdurch ein Konzentrationsungleichgewicht bei thermodynamisch unveränderter Gleichgewichtslage der Reaktion entsteht.

Figur 3 zeigt drei simulierte Konzentrationskurven als Ergebnis des erfindungsgemäßen Verfahrens. Dabei zeigt Figur 3a die Gesamtkonzentration des gebundenen FRET-Paares in willkürlichen Einheiten. Der steile Anstieg 10 im linken Bereich des Diagramms repräsentiert das Verhalten während eines UV-Strahlungspulses. Der rechts darauf folgende Bereich 12, der in Figur 3b vergrößert dargestellt ist, zeigt die Relaxation in den Gleichgewichtszustand. Durch die oben erläuterte Asymmetrie ist der Zustand DA<sub>+</sub> unterbesetzt. Es erfolgt daher eine Relaxation zugunsten dieses Zustandes.

Figur 3c zeigt dagegen die Konzentration des Donors und des FRET-Paares im ausgeschalteten Zustand. Sie ist der zuvor erläuterten Kurve genau entgegengesetzt.

Man beachte, dass die gezeigten Kurven Konzentrationskurven sind, die nicht mit dem tatsächlich detektierten Fluoreszenzsignal übereinstimmen, das u.a. von den Eigenschaften des hierfür verwendeten Anregungslichtes abhängt.

Bei einem typischen Experiment wird beispielsweise im Anschluss an die zur Schaltung des Photochroms geeigneten Bestrahlung eine wesentlich intensitätsschwächere Anregungsbestrahlung der Probe durchgeführt. Die Wellenlänge dieser Detektionsbestrahlung ist in der Regel so gewählt, dass der FRET-Donor energetisch angeregt wird, ohne dass jedoch eine nennenswerte Schaltung des photochromen FRET-Akzeptors damit einhergeht.

Für die Wahl der detektierten Fluoreszenzwellenlänge gibt es verschiedene Möglichkeiten. So kann beispielweise die Fluoreszenz des FRET-Donors selbst gemessen werden. Diese wird mit zunehmender Konzentration von gebundenen FRET-Paaren im eingeschalteten Zustand abnehmen, da die FRET-Effizienz insgesamt ansteigt und somit der Donorfluoreszenz ein wachsender Konkurrenzkanal entsteht. Andererseits kann auch die Fluoreszenz des FRET-Akzeptors gemessen werden, sofern es sich dabei um ein fluoreszentes Photochrom handelt. Diese verhält sich genau umgekehrt zu der Donorfluoreszenz. Weiter ist es auch möglich, die Fluoreszenz eines dritten Fluorophors zu messen, der ebenfalls in dem Reaktionsprodukt vorliegt, welches das gebundene FRET-

Paar enthält, und der als ein weiterer, nicht photochromer, jedoch fluoreszenter FRET-Akzeptor zu dem speziell gewählten FRET-Donor wirkt. Dieser zusätzliche FRET-Akzeptor stellt einen Abregungskanal dar, der zu der Donorfluoreszenz und der Fluoreszenz des ersten FRET-Akzeptors in Konkurrenz steht. Ein Schema einer entsprechenden, beispielhaften Komplexbildungsreaktion, z.B. einer DNA-Hybridisierung mit zwei FRET-Akzeptoren ist in Figur 4 dargestellt. „D“ bezeichnet hierbei den FRET-Donor, „pc“ den ersten photochromen FRET-Akzeptor und „A“ den weiteren, nicht photochromen, fluoreszenten FRET-Akzeptor. Im gebundenen Zustand sind D und pc dicht beieinander angeordnet. A ist in größerer Entfernung zu D angeordnet. In eingeschaltetem Zustand von pc ergibt sich daher eine hohe FRET-Effizienz zwischen D und pc, welche diejenige zwischen D und A deutlich übertrifft, d.h. es kann praktisch keine Energie von D auf A übertragen werden. Bei spezifischer Anregung von D kann daher keine Fluoreszenz von A beobachtet werden. Wird pc dagegen durch einen geeigneten Lichtpuls ausgeschaltet, überwiegt FRET zwischen D und A, sodass bei isolierter Beobachtung der Fluoreszenz von A selektiv der Komplex im ausgeschalteten Zustand von pc beobachtet werden kann, was zu einer sehr sensitiven Messung von dessen Relaxation führt.

Natürlich stellen die hier beschriebenen und in den Zeichnungen dargestellten Beispiele lediglich besonders vorteilhafte Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Verfahrens dar, die im Rahmen der offenbarten Lehre auf vielfache Weise variierbar sind. Insbesondere die spezielle Wahl der verwendeten Spezies, der Wellenlängen und Intensitäten des zur Schaltung des Photochroms und / oder zur Anregung des FRET-Donors verwendeten Lichtes können in weitem Umfang abgewandelt werden. Z.B. erlaubt das erfindungsgemäße Verfahren, da im Wesentlichen nur reversible Prozesse beteiligt sind, repetitive Verfahrensvarianten zur Verbesserung des Signal/Rausch-Verhältnisses. Auch räumlich mäandrierende Anregungen durch Bewegung der Probe (z.B. im Mikroskop) und / oder des anregenden Lichtstrahls sind je nach dem konkreten experimentellen Ziel einsetzbar.

## Patentansprüche

- 5 1. Verfahren zur Bestimmung einer charakteristischen, kinetischen Größe einer chemischen Reaktion zwischen einer Mehrzahl chemischer Spezies in einer Probe, wobei wenigstens eine Spezies wenigstens einen Fluorophor enthält, umfassend die folgenden Schritte:
- 10 - Erzeugen eines Ungleichgewichtszustandes der chemischen Reaktion durch Beaufschlagung der Probe mit Licht,
- zeitaufgelöste Beobachtung wenigstens eines Abschnitts der Relaxation der Konzentrationen der beteiligten Spezies anhand eines Fluoreszenzsignals wenigstens eines Fluorophors,
- dadurch gekennzeichnet,**
- 15 dass wenigstens ein zu untersuchendes Produkt der chemischen Reaktion eine Verbindung zweier Spezies umfasst, die jeweils einen Partner eines aus FRET-Donor und FRET-Akzeptor bestehenden FRET-Paares enthalten, wobei
- der FRET-Akzeptor ein Photochrom ist, dessen Absorptionsspektrum durch Beaufschlagung mit Licht einer geeigneten Wellenlänge änderbar ist,
- 20 - der FRET-Donor ein Fluorophor ist, dessen Emissionsspektrum mit dem Absorptionsspektrum des FRET-Akzeptors einen Überlappungsbereich aufweist, dessen Größe von dem photochromen Zustand des FRET-Akzeptors abhängt, und
- das zur Erzeugung des Ungleichgewichtszustandes der chemischen Reaktion verwendete Licht eine den photochromen Zustand des FRET-Akzeptors schaltende
- 25 Wellenlänge aufweist.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass zur Beobachtung der Relaxation die Fluoreszenz des FRET-Donors gemessen wird.
- 30 3. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass der photochrome FRET-Akzeptor ein Fluorophor ist und zur Beobachtung der Relaxation die Fluoreszenz des photochromen FRET-Akzeptors gemessen wird.
4. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass
- 35 das zu untersuchende Produkt einen weiteren Fluorophor umfasst, der einen weiteren FRET-Akzeptor zu dem FRET-Donor darstellt.



5. Verfahren nach Anspruch 4, **dadurch gekennzeichnet**, dass der weitere FRET-Akzeptor kein Chromophor ist.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 4 oder 5, **dadurch gekennzeichnet**, dass zur Beobachtung der Relaxation die Fluoreszenz des weiteren FRET-Akzeptors gemessen wird.
7. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Änderung des photochromen Zustandes des FRET-Akzeptors in eine erste Richtung durch Bestrahlung der Probe mit Licht einer ersten Wellenlänge erfolgt und die Änderung des photochromen Zustandes des FRET-Akzeptors in eine zweite Richtung durch Bestrahlung mit Licht einer zweiten Wellenlänge erfolgt.
8. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Änderung des photochromen Zustandes des FRET-Akzeptors in wenigstens eine Richtung durch Bestrahlung mit ultravioletttem Licht erfolgt.
9. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Änderung des photochromen Zustandes des FRET-Akzeptors in wenigstens eine Richtung durch Bestrahlung mit sichtbarem Licht erfolgt.
10. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Anregung des FRET-Donors zur Erzeugung der zu beobachtenden Fluoreszenz mit sichtbarem Licht erfolgt.
11. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Bestrahlungsintensität zur Änderung des photochromen Zustandes des FRET-Akzeptors wesentlich stärker ist als die Bestrahlungsintensität zur Erzeugung der zu beobachtenden Fluoreszenz.
12. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass zur Änderung des photochromen Zustandes des FRET-Akzeptors die Probe zeitlich moduliert bestrahlt wird.
13. Verfahren nach den Ansprüchen 7 und 12, **dadurch gekennzeichnet**, dass zur Änderung des photochromen Zustandes des FRET-Akzeptors die Probe alternierend mit Licht der ersten und der zweiten Wellenlänge bestrahlt wird.

14. Vorrichtung zur Bestimmung einer charakteristischen, kinetischen Größe einer chemischen Reaktion zwischen einer Mehrzahl chemischer Spezies in einer Probe, wobei wenigstens eine Spezies wenigstens einen Fluorophor enthält, umfassend eine Probenaufnahme, wenigstens eine steuerbare Lichtquelle zur zeitlich und spektral gesteuerten Bestrahlung der in der Probenaufnahme befindlichen Probe, wenigstens einen zur zeitaufgelösten Messung geeigneten Lichtdetektor zur Erfassung von Fluoreszenzlicht, welches von der Probe infolge der Bestrahlung emittiert wird, und eine Steuereinheit, welche zur Ansteuerung der wenigstens einen Lichtquelle und des wenigstens einen Lichtdetektors gemäß einem Verfahren nach einem der vorgenannten Ansprüche geeignet eingerichtet ist.
15. Vorrichtung nach Anspruch 14, **dadurch gekennzeichnet**, dass weiter eine Auswerteeinheit zur automatisierten Auswertung der erfassten Fluoreszenzlicht-Daten zur Berechnung der charakteristischen, kinetischen Größe vorgesehen ist.
16. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 14 oder 15, **dadurch gekennzeichnet**, dass alle Vorrichtungskomponenten in einem tragbaren Gehäuse integriert sind.

1/2

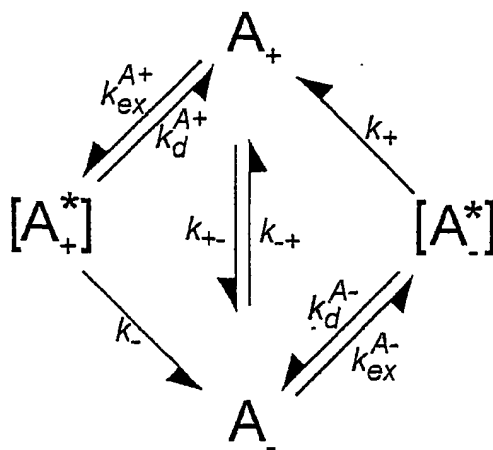


Fig. 1

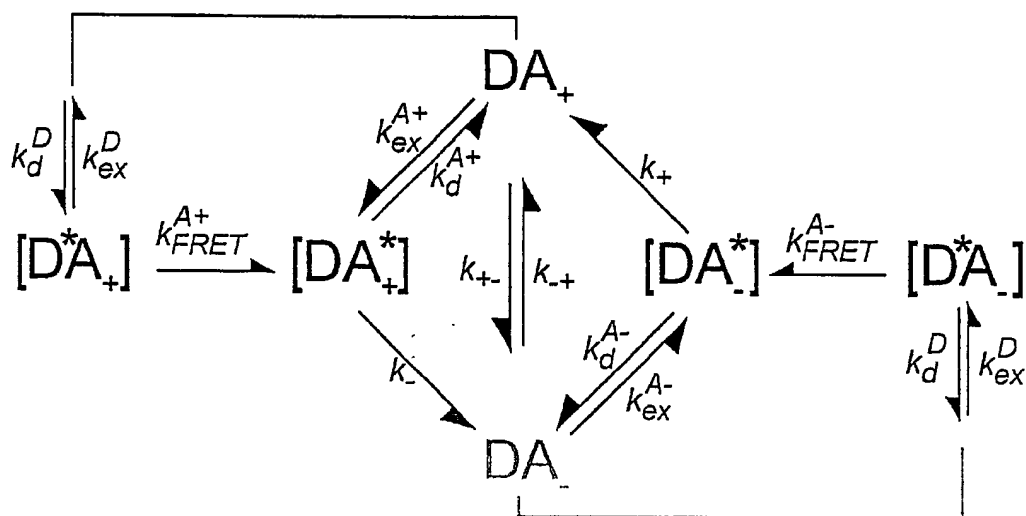
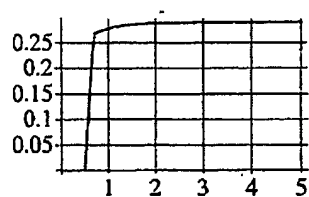
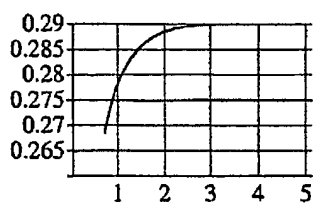
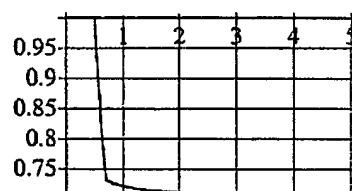
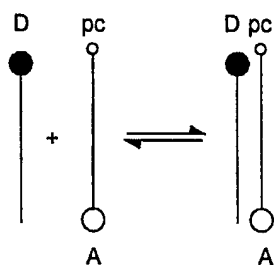


Fig. 2

**Fig. 3****a)****b)****c)****Fig. 4**

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP2004/008729

| <b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b><br>IPC 7 G01N33/542 G01N33/58  |  |  |
|---|--|--|
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC   |  |  |
| <b>B. FIELDS SEARCHED</b><br>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)<br>IPC 7 G01N  |  |  |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched   |  |  |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)<br>EPO-Internal, INSPEC, WPI Data  |  |  |
| <b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>   |  |  |
| Category *  | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No.  |
| X   | LUCIANA GIORDANO ET AL:<br>"Diheteroarylethenes as thermally stable<br>photoswitchable acceptors in photochromic<br>fluorescence resonance energy transfer<br>(pcFRET)"<br>J. AM. CHEM. SOC.,<br>vol. 124, no. 25,<br>26 June 2002 (2002-06-26), pages<br>7481-7489, XP002299197<br>cited in the application<br>page 7487, column 2, line 9 - page 7488,<br>column 2, line 5; figure 3 | 1-16   |
| X   | EP 0 668 498 A (HAMAMATSU PHOTONICS KK)<br>23 August 1995 (1995-08-23)<br>cited in the application<br>figures 3-5  | 14-16  |
| -/--  |  |  |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.   |  |  |
| * Special categories of cited documents :<br>*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance<br>*E* earlier document but published on or after the international filing date<br>*L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)<br>*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means<br>*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed<br>*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention<br>*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone<br>*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.<br>*G* document member of the same patent family |  |  |
| Date of the actual completion of the international search<br><br>19 October 2004  |  | Date of mailing of the international search report<br><br>04/11/2004 |
| Name and mailing address of the ISA<br>European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2<br>NL - 2280 HV Rijswijk<br>Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,<br>Fax (+31-70) 340-3016   |  | Authorized officer<br><br>Consalvo, D                                |

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP2004/008729

| C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |  |                       |
|--|--|-----------------------|
| Category *   | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No. |
| A  | KIRSCH A K ET AL: "Fluorescence resonance energy transfer detected by scanning near-field optical microscopy"<br>JOURNAL OF MICROSCOPY BLACKWELL SCIENCE FOR R. MICROSC. SOC UK,<br>vol. 194, 1999, pages 448-454, XP002299195<br>ISSN: 0022-2720<br>page 448 - page 453<br>-----  | 1-16                  |
| A  | CREEMERS T M H ET AL: "Red-shifted mutants of green fluorescent protein: reversible photoconversions studied by hole-burning and high-resolution spectroscopy"<br>CHEMICAL PHYSICS ELSEVIER NETHERLANDS,<br>vol. 275, no. 1-3, 2002, pages 109-121, XP002299196<br>ISSN: 0301-0104<br>paragraphs '001.!, '003.!<br>----- | 1-16                  |

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP2004/008729

| Patent document<br>cited in search report |   | Publication<br>date | Patent family<br>member(s) | Publication<br>date |
|---|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| EP 0668498                                | A | 23-08-1995          | JP 3448090 B2              | 16-09-2003          |
|   |   |                     | JP 7229835 A               | 29-08-1995          |
|   |   |                     | DE 69531515 D1             | 25-09-2003          |
|   |   |                     | DE 69531515 T2             | 17-06-2004          |
|   |   |                     | EP 0668498 A2              | 23-08-1995          |
|   |   |                     | US 5911952 A               | 15-06-1999          |
|   |   |                     | US 5776782 A               | 07-07-1998          |
| <hr/>                                     |   |                     |                            |                     |